

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



EP 0 943 685 A2

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(12) (51) Int. Cl.⁶ C12N 15/12, C07K 14/705,
C07K 16/28, A61K 48/00,
(43) Veröffentlichungstag: 22.09.1999 Patentblatt 1999/38
C12Q 1/68, G01N 33/576,
(21) Anmeldenummer: 99101164.4
G01N 33/68, C12N 5/10
(22) Anmeldetag: 22.01.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT U LU
MC NL PT SE
Benannte Erfindungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 11.02.1998 DE 19803351

(71) Anmelder:
BASF AKTIENGESellschaft
67056 Ludwigshafen (DE)
(72) Erfinder:
• Kögler, Burkhard, Dr.
• 67117 Ludwigshafen (DE)
• Otterbach, Bernd, Dr.
• 67061 Ludwigshafen (DE)

(54) Neuer G-Protein-gekoppelter Rezeptor aus menschlichem Gehirn

(57) Neuer G-Protein-gekoppelter Rezeptor aus menschlichem Gehirn, das dafür codierendes Gen und seine Verwendung

Beschreibung

EP 0 943 685 A2

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aus humanem Gehirn, dessen Gene und Verwendung.

[0002] G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen eine Superfamilie integrierter Membranproteine dar, Familienmitglieder sind Rezeptoren für alle Typen chemischer Botenstoffe, aber auch Sensoren für Licht und Geruch. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommen in fast allen Organismen vor.

[0003] Die Rezeptoren sind charakterisiert durch eine Aminosäuresequenz mit 7 ausgeprägt hydrophoben Bereichen. Diese stellen höchstwahrscheinlich membranständige Domänen dar und geben der Familie ihren zweiten Namen: 7-Transmembran-Domänen Rezeptoren.

[0004] Die Liganden dieser Rezeptorfamilie sind mit biogenen Aminen (z.B. Adrenalin, Serotonin, Histamin), Peptidhormonen (z.B. Angiotensin, Endorphin, Bradykinin), Neurotransmittern (z.B. NPY, Substanz P, Opioide) und Proteinen (z.B. Chemokine, Thrombin) sehr vielfältig. Alle diese Messenger sind durch Interaktion mit G-Proteinen an der Signübertragung in das Innere der Zelle beteiligt. Als Effektoren sind bekannt: Adenylatcyclase, Phospholipase C, Phosphodiesterase.

[0005] Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden in drei Unterfamilien unterteilt: die Rhodopsin-Unterfamilie, Calcitonin-Unterfamilie und Glutamatmetabotrope-Unterfamilie.

[0006] Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Protein, enthaltend die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäuren erhaltene Sequenz, wobei wenigstens noch eine der wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID NO:2 dargestellten Proteins erhalten bleibt.

[0007] Die wesentliche biologische Eigenschaft ist in der Aktivität als Rezeptor, insbesondere als G-Protein-gekoppelter Rezeptor zu sehen.

[0008] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Proteine mit G-Protein-gekoppelter Rezeptoraktivität, die ausgehend von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz durch gezielte Veränderungen herstellbar sind. Beispielsweise können bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Bestizität) ersetzt werden. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren hinzugefügt oder entfernt werden, oder mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die solchenmaßen gegenüber der SEQ ID NO:2 veränderten Proteine besitzen wenigstens 50 %, bevorzugt wenigstens 75 %, Homologie zu SEQ ID NO:2, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85, 2444-2448.

[0009] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für die o.g. Proteine codieren, insbesondere solche mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Primärstruktur.

[0010] Die vorliegende cDNA kann durch dem Fachmann geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden in verschiedenen Expressionssystemen zur Expression gebracht werden. Dies sind beispielsweise pro- oder eukaryotische Vektorsysteme, wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Plasmide; Phagenide, Phagenen.

[0011] Dazu wird die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz üblicherweise mit gentechnischen Regulationsselementen wie Transkriptions- und Translationssignalen funktionsell verknüpft. Mit den solchenmaßen hergestellten rekombinanten Nukleinsäurekonstrukten werden anschließend Wirtsorganismen transformiert.

[0012] Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Verknüpfung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit einem Promotor, wobei der Promotor 5' upstream zu liegen kommt. Weitere Regulationsprofile wie Terminatoren, Polyadenylierungssignale, Enhancer können in dem Nukleinsäurekonstrukt Anwendung finden.

[0013] Als Wirtszellen sind Bakterien wie *Escherichia coli*, eukaryotische Mikroorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise S9 oder CHO-Zellen, geeignet.

[0014] Gewünschtemaße kann das G-Protein-gekoppelte auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

[0015] Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um eine cDNA, die für ein neues Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie kodiert. Sequenzvergleiche zeigen Verwandtschaft mit Endothelinrezeptoren und Endothelinrezeptor-ähnlichen Sequenzen.

[0016] Die vorliegende Nukleotidssequenz wurde ursprünglich in mehreren cDNA-Bibliotheken aus humanem Gehirn und Rückenmark identifiziert. Die Analyse der Verteilung der zugehörigen mRNA in 50 verschiedenen menschlichen Geweben ergab fast ausschließliche Expression im Gehirn.

[0017] Das durch die vorliegende cDNA kodierte Polypeptid läßt sich zweifelsfrei als G-Protein-gekoppelter Rezeptor identifizieren. Die 7 Transmembran-Domänen, das Kennzeichen dieser Proteinfamilie, lassen sich leicht im Hydrophilizitäts-Plot (Kyte, J. and R.F. Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)) finden. Die große Verwandschaft auf Aminosäureebene findet sich mit 52 % Identität zu einem putativen Endothelinrezeptor Typ B-ähnlichen Protein humanen Ursprungs (GenBank Accession Nummer U87460, (FastA-Programm, Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85, 2444-2448).

[0018] In besonderen Fällen kann das G-Protein-gekoppelte auch in transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen

Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der entsprechenden RNA zu programmieren.

[0019] Darüberhinaus kann das Genprodukt auch in Form therapeutisch oder diagnostisch geeigneter Fragmente exprimiert werden. Zur Isolation des rekombinanten Proteins können Vektorsysteme oder Oligonukleotide verwendet werden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidssequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Als solche "Tags" sind in der Literatur z.B. Hexa-Histidin-Anker bekannt oder Epitope, die als Antigene verschiedener Antikörper erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor (N.Y.) Press).

[0020] Ausgehend von der Peptidsequenz können synthetische Peptide generiert werden, die als Antigene für die Produktion von Antikörpern eingesetzt werden. Es ist auch möglich, das Polypeptid oder Bruchstücke davon zur Generierung von Antikörpern einzusetzen.

[0021] Die Herstellung von Antikörpern ist eine dem Fachmann geläufige Tätigkeit. Mit Antikörpern sind sowohl polyclonale, monoklonale, humane oder humanisierte Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint.

[0022] Die vorliegende cDNA bietet außerdem die Voraussetzung, die genomische Sequenz dieses neuen G-Proteingekoppelten Rezeptors zu klonieren. Darunter fällt auch die dazugehörige regulatorische oder Promotorsequenz, die beispielsweise durch Sequenzierung des 5' upstream Bereiches der vorliegenden cDNA zugänglich wird. Die Sequenzinformation der cDNA ist auch die Grundlage für die Herstellung von antisense Molekülen oder Ribozymen.

[0023] Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes der Nukleotidssequenz oder Teilen davon ist die Erzeugung transgener Tiere. Transgene Überexpression oder genetischer Knockout der Sequenzinformation in geeigneten Tiermodellen kann wertvolle weitere Informationen über die (Patho-)Physiologie des neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

[0024] In Situationen, in denen ein Mangel an dem beschriebenen Rezeptor (Protein gemäß Anspruch 1) herrscht, können mehrere Methoden zur Substituierung eingesetzt werden. Zum einen kann das Protein, natürlich oder rekombinant direkt, oder durch geeignete Maßnahmen in Form seiner kodierenden Nukleinsäure (DNA oder RNA) appliziert werden. Dazu können sowohl virale, als auch nichtvirale Vehikel zum Einsatz kommen.

[0025] Ein weiterer Weg bietet sich durch die Stimulation des endogenen, körpereigenen Genes durch geeignete Mittel. Auch der turn-over oder die Inaktivierung z.B. durch Rezeptorkinasen können blockiert werden. Schließlich können Agonisten dieses Rezeptors zum Einsatz gelangen.

[0026] In Situationen, in denen überschüssiger Rezeptor vorliegt, können verschiedene Inhibitoren eingesetzt werden. Diese Inhibition kann sowohl durch antisense Moleküle oder Ribozyme, oder Antikörper und Oligonukleotide, als auch durch niedermolekulare Verbindungen erreicht werden. Darüberhinaus kann der Rezeptor auch durch Antagonisten blockiert werden.

[0027] Weiterhin können die cDNA, die genomische DNA, der Promotor, als auch das Polypeptid, sowie Teilfragmente davon in rekombinanter oder nichtrekombinanter Form zur Ausarbeitung eines Testsystems verwendet werden. Dieses Testsystem ist geeignet, die Aktivität des Promotors oder des Proteins in Anwesenheit einer Testsubstanz zu messen. Bevorzugt handelt es sich dabei um einfache Meßmethoden (colorimetrischer, luminometrischer, fluorimetrischer, immunologischer oder radioaktiver Art.) die die schnelle Meßbarkeit einer Vielzahl von Testsubstanzen erlauben. Die beschriebenen Testsysteme erlauben die Bindung oder Agonisierung oder Antagonisierung von Testsubstanzen in Bezug zum neuen Rezeptor zu beschreiben.

[0028] Die Bestimmung von Menge, Aktivität und Verteilung des Rezeptors oder seiner zugrundeliegenden mRNA im menschlichen Körper kann zur Diagnose, Prädisposition und zum Monitoring bei bestimmten Erkrankungen dienen. Desgleichen kann die Sequenz der cDNA sowie der genomischen Sequenz zu Aussagen über genetische Ursachen und Prädispositionen bestimmter Erkrankungen herangezogen werden. Dazu können sowohl DNA/RNA-Proben, sowie unnatürliche DNA/RNA-Proben, als auch Antikörper verschiedenster Art benutzt werden. Dabei dient die beschriebene Nukleotidssequenz oder Teile davon in Form geeigneter Proben zur Aufdeckung von Punktmutationen oder Deletionen/Insertionen.

[0029] Weiterhin kann das beschriebene Protein benutzt werden, um seine natürlichen Liganden zu bestimmen und zu isolieren. So kann der Rezeptor rekombinant in Zellkultur exprimiert und sein Aktivierungszustand z.B. anhand des cAMP-Spiegels abgeleitet werden. Der cAMP-Spiegel läßt sich immunologisch oder mittels Reporter-Technologie ermitteln. Damit ergibt sich auch ein diagnostisches Verfahren den Spiegel des Rezeptorliganden in Körperflüssigkeiten oder Geweben zu bestimmen.

[0030] Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz und das von ihr kodierte Protein können zur Entwicklung von Reagenzien, Agonisten und Antagonisten zur Diagnose und Therapie von chronischen und akuten Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems, wie Alzheimer's, Depression, Demenz, Motilitätsstörungen, Hirntumore, Schmerz, Schizophrenie, Angstzustände, Schlaganfall, Schlafstörungen, Apnoen, Husten, Psychosen, Parkinson's, Epilepsie, ALS, Drogenabhängigkeit, Lähmungen, sowie zur Cerebroprotektion und bei Erkrankungen mit nervöser Komponente, wie Obesity, Anorexie, Bulimie eingesetzt werden.

[0031] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Nukle-

insäure nach Anspruch 3 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer bekannten Menge an Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder einer bekannten Menge an Oligonukleotiden, die als Primer für eine Amplifikation der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 geeignet sind,

b) Nachweis der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 durch spezifische Hybridisierung oder PCR-Amplifikation,

c) Vergleich der Menge an hybridisierender Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder an durch PCR Amplifikation gewonnener Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 mit einem Standard.

[0032] Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis eines Proteins gemäß Anspruch 1 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

a) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Antikörper, der spezifisch gegen das Protein gemäß Anspruch 1 gerichtet ist,

d) Nachweis des Antikörper/Antigenkomplexes,

c) Vergleich der Mengen des Antikörper/Antigenkomplexes mit einem Standard.

[0033] Als Standard können biologische Proben wie Gewebestücke, Serum oder Blut dienen, die von gesunden Probanden entnommen wurden.

Beispiel 1

Klonierung der Rezeptor cDNA

[0034] Bei der Sequenzanalyse von cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn wurde zunächst eine Teilsequenz identifiziert. Die Sequenz dieses Teildones umfaßt den Bereich zwischen Nukleotidposition 352 und 2411 in SEQ ID NO:1.

[0035] Aus einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn (Human Brain 5'Stretch Plus cDNA Library, # HL50181, Fa. Clontech, Jahr 1997) wurde die Gesamtsequenz SEQ ID NO:1 mittels geschachtelter Polymerase Chain Reaktion amplifiziert. Dazu kamen folgende Oligonukleotidprimer zur Anwendung:

PCR1: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4;

PCR2: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 5.

Beispiel 2

Expression des neuen Rezeptors in menschlichen Geweben

[0036] Die Expression des neuen Rezeptors wurde in 50 verschiedenen menschlichen Geweben mittels RNA-Dot-blot-Analyse untersucht. Ein Blot der Firma Clontech (#7710-1) wurde dazu mit einer Rezeptor-Probe hybridisiert. Die Probe wurde durch *in vitro* Transkription der entsprechenden cDNA in Anwesenheit Digoxigenin-markierter Nukleotide hergestellt. Nach stringenter Waschen wurde das Transkript hauptsächlich in Gehirngewebe nachgewiesen.

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft
<120> Neuer G-Protein gekoppelter Rezeptor aus menschlichem Hirn
<130> DE 0050/48774
<140>
<141>
<150> DE 19805351.7
<151> 1998-02-11
<160> 5
<170> Patentin Ver. 2.0
<210> 1
<211> 2411
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> 5'UTR
<222> (1)..(19)
<220>
<221> CDS
<222> (20)..(1462)
<220>
<221> 3'UTR
<222> (1463)..(2411)
<400> 1
gtctctcgtc catccagcc atg cgg tgg ctg ccc ctg gct gtc tct ctt 52
Met Arg Trp Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Leu 10
1 5 10
45 gct ctg att ctg gct ctg ggg cta agc agc ggc tct ggg ggc gcc ccc 100
Ala Val Ile Leu Ala Val Gly Leu Ser Arg Val Ser Gly Gly Ala Pro 25
15 20 25
50 ctg cac ctg ggc agc cac aga gcc gag acc cag gag cag cag agc cga 148
Leu His Leu Gly Arg His Arg Ala Glu Thr Glu Glu Ser Arg 30
35 40
tcc aag agc acc gag gat gag gag gcc aag ggc ctg cag cat 136
Ser Lys Arg Gly Thr Glu Asp Glu Ala Lys Gly Val Glu Tyr 45
50
55 gtc cct gag gag tgg ggc gag tac ccc cgg ccc att cac cct gct ggc 244
Val Pro Glu Glu Trp Ala Glu Tyr Pro Arg Pro Ile His Pro Ala Gly 60
65 70 75
10 ctg cag cca acc aag ccc ctg ctg gcc acc agc cct aac ccc gag aag 292
Leu Glu Pro Thr Lys Pro Leu Val Ala Thr Ser Pro Asn Pro Asp Lys 80
85 90
15 gat ggc ggc acc cca gag agt ggc gag gaa ctg agc ggc aat ctg aca 340
Asp Gly Gly Thr Pro Asp Ser Gly Glu Leu Arg Gly Asn Leu Thr 95
100 105
20 ggc gca cca ggc cag agc cta cag atc cag aac ccc ctg tac ccg ctg 388
Gly Ala Pro Gly Glu Arg Leu Glu Ile Glu Asn Pro Leu Tyr Pro Val 110
115 120
25 acc gag agc tcc tac agt gcc tac gcc atc atg cct ctg ggc ctg ctg 436
Thr Glu Ser Ser Tyr Ser Ala Tyr Ala Ile Met Leu Leu Ala Leu Val 125
130 135
30 gtc ttt ggc ctg ggc att ctg ggc aac ctg tgg gtc atg tgc atc ggc 484
Val Phe Ala Val Gly Ile Val Gly Asn Leu Ser Val Met Cys Ile Val 140
145 150 155
35 tgg cac agc tac tac ctg aag agc gcc tgg aac tcc atc ctt gcc agc 532
Trp His Ser Tyr Tyr Leu Lys Ser Ala Trp Asn Ser Ile Leu Ala Ser 160
165 170
40 ctg gcc ctg tgg gat ttt ctg ggc ctc ttt ttc tgc ctc cct atc gtc 580
Leu Ala Leu Trp Asp Phe Leu Val Leu Phe Cys Leu Pro Ile Val 175
180 185
45 atc ttc aac gag atc acc aag cag agc cta ctg ggt gac gtc tct tgt 628
Ile Phe Asn Glu Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Gly Asp Val Ser Cys 190
195 200
50 cgt gcc ctg ccc ttc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acg act ttc 676
Arg Ala Val Pro Phe Met Glu Val Ser Ser Leu Gly Val Thr Thr Phe 205
210 215
55 agc ctg tgt gcc ctg ggc att gac cgc ttc cac ctg gcc acc agc acc 724
Ser Leu Cys Ala Leu Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr 220
225 230 235
ctg ccc aag ctg agc ccc atc gag cgg tgc caa tcc atc ctg gcc aag 772

5 Leu Pro Lys Val Arg Pro Ile Glu Arg Cys Gln Ser Ile Leu Ala Lys 240 245 250
 6 ttc gct gtc atc tgg gtg ggc tcc atg acg ctg gct gct gtc cct gag ctc 820
 Leu Ala Val Ile Trp Val Gly Ser Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu 255 260 265
 10 ctg ctg tgg cag ctg gca cag gag cct gcc ccc acc atg ggc acc ctg 868
 Leu Leu Trp Gln Leu Ala Gln Glu Pro Ala Pro Thr Met Gly Thr Leu 270 275 280
 15 gac tca tgc atc atg aaa ccc tca gcc agc ctg ccc gag tcc ctg tat 916
 Asp Ser Cys Ile Met Lys Pro Ser Ala Ser Leu Pro Glu Ser Leu Tyr 285 290 295
 20 tca ctg gtg atg acc tac cag aac gcc cgc atg tgg tgg tac ttt ggc 964
 Ser Leu Val Met Thr Tyr Gln Asn Ala Arg Met Trp Tyr Phe Gly 300 305 310 315
 tgc tac ttc tgc ctg ccc atc ctg ttc aca gtc acc tgc cag ctg gtg 1012
 Cys Tyr Phe Cys Leu Pro Ile Leu Phe Thr Val Thr Cys Gln Leu Val 320 325 330
 25 aca tgg cgg gtg cga gcc cct cca ggg agy aag tca gag tgc agy gcc 1060
 Thr Trp Arg Val Arg Gly Pro Pro Gly Arg Lys Ser Glu Cys Arg Ala 335 340 345
 30 agc aag cac gag cag tgt gag agc cag ctc aac agc acc gtg gtg ggc 1108
 Ser Lys His Glu Gln Cys Glu Ser Gln Leu Asn Ser Thr Val Val Gly 350 355 360
 35 ctg acc gtg gtc tac gcc ttc tgc acc ctc cca gag aac gtc tgc aac 1156
 Leu Thr Val Val Tyr Ala Phe Cys Thr Leu Pro Glu Asn Val Cys Asn 365 370 375
 40 atc gtg gtg gcc tac ctc tcc acc gag ctg acc cgc cag acc ctg gac 1204
 Ile Val Val Ala Tyr Leu Ser Thr Glu Leu Thr Arg Gln Thr Leu Asp 380 385 390 395
 45 ctc ctg ggc ctc atc aac cag ttc tcc acc ttc ttc aag ggc gcc atc 1252
 Leu Leu Gly Leu Ile Asn Gln Phe Ser Thr Phe Phe Lys Gly Ala Ile 400 405 410
 acc cca gtg ctg ctc ctt tgc atc tgc agy ccy ctg ggc cag gcc ttc 1300
 Thr Pro Val Leu Leu Cys Ile Cys Arg Pro Leu Gly Gln Ala Phe 415 420 425
 50 ctg gac tgc tgc tgc tgc tgc tgc gag gag tgc ggc ggc gct tgc 1348
 Leu Asp Cys Cys Cys Cys Cys Cys Glu Glu Cys Gly Gly Ala Ser 430 435 440

430 435 440
 gag gcc tct gct gcc aat ggg tgg gac aac aag ctc aag acc gag gtg 1396
 Glu Ala Ser Ala Ala Asn Gly Ser Asp Asn Lys Leu Lys Thr Glu Val 445 450 455
 460 tcc tct tcc atc tac ttc cac aag ccc agg gag tca ccc cca ctc ctg 1444
 Ser Ser Ile Tyr Phe His Lys Pro Arg Glu Ser Pro Pro Leu Leu 465 470 475
 480 ccc ctg ggc aca cct tgc taaggcccca gtagggtgg ggaggagg 1492
 Pro Leu Gly Thr Pro Cys 485
 agaggccgc accccgcgc gtgtgtgtg ttcttcccc atagggttg cttgttgc 1552
 tgcttctgt tctagggtg gacttggtc ctctgtcaa ggttggaa tgcacagcc 1612
 cctccccc acagggcctt tctgtccct tgtgggacct tccacacctg tcttccac 1672
 tggtagggc tgaatgtctt agtctctag aactgcccag aaactctgag tccacagcc 1732
 tggagaccag aacttgcct gccctccctt ggttccagtc tctcttctt ctctctgct 1792
 tggacacctg ccatacttta gttgtgcct tccaggcat catcttccca cccacacct 1852
 gggggcccat ctggaatgg gggctcctg gggccagccc agtgggctc accacacct 1912
 tcttttttt ttgtttttt gagatggagt ctgtctctgt tggccaggct ggagtaact 1972
 tgcctgatgt cagctccctg caacctccgc ctcttggtt caagcattc tctgtccca 2032
 gccctctgag tagctggat tacaggtgtg caccacaca cccggtaaat ttgtgtatt 2092
 gtagaaggc cgggggttca ccatgttggc caggctgtg ttgaactcct gacctcaagt 2152
 gatctgctg ccttgacct ccaaatgtct gggattacag gtgtgagctg ccaagccag 2212
 cccagatca ctctctctg gacacatct gtccagatcc tggatgctc cctcactgg 2272
 tgccttctt tcttccagag gatttctct tcttctctc tcttcttctt gggatccctg 2332
 ggttgcctg tcccaacct ctgttaggt gcttcccat agggagcct tcttgagaa 2392
 caataaacta ggtagact 2411
 <210> 2
 <211> 481

EP 0 943 685 A2

<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <<00> 2
Met Arg Trp Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala
1 5 10 15
Val Gly Leu Ser Arg Val Ser Gly Gly Ala Pro Leu His Leu Gly Arg
20 25 30
His Arg Ala Glu Thr Gln Glu Gln Ser Arg Ser Lys Arg Gly Thr
35 40 45
Glu Asp Glu Glu Ala Lys Gly Val Gln Gln Tyr Val Pro Glu Glu Trp
50 55 60
Ala Glu Tyr Pro Arg Pro Ile His Pro Ala Gly Leu Gln Pro Thr Lys
65 70 75 80
Pro Leu Val Ala Thr Ser Pro Asn Pro Asp Lys Asp Gly Gly Thr Pro
85 90 95
Asp Ser Gly Gln Glu Leu Arg Gly Asn Leu Thr Gly Ala Pro Gly Gln
100 105 110
Arg Leu Gln Ile Gln Asn Pro Leu Tyr Pro Val Thr Glu Ser Ser Tyr
115 120 125
Ser Ala Tyr Ala Ile Met Leu Leu Ala Leu Val Phe Ala Val Gly
130 135 140
Ile Val Gly Asn Leu Ser Val Met Cys Ile Val Trp His Ser Tyr Tyr
145 150 155 160
Leu Lys Ser Ala Trp Asn Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ala Leu Trp Asp
165 170 175
Phe Leu Val Leu Phe Cys Leu Pro Ile Val Ile Phe Asn Glu Ile
180 185 190
Thr Lys Gln Arg Leu Leu Gly Asp Val Ser Cys Arg Ala Val Pro Phe
195 200 205
Met Glu Val Ser Ser Leu Gly Val Thr Thr Phe Ser Leu Cys Ala Leu
210 215 220
Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr Leu Pro Lys Val Arg
225 230 235 240

EP 0 943 685 A2

5 Pro Ile Glu Arg Cys Gln Ser Ile Leu Ala Lys Leu Ala Val Ile Trp
245 250 255
Val Gly Ser Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu Leu Trp Gln Leu
260 265 270
Ala Gln Glu Pro Ala Pro Thr Met Gly Thr Leu Asp Ser Cys Ile Met
275 280 285
Lys Pro Ser Ala Ser Leu Pro Glu Ser Leu Tyr Ser Leu Val Met Thr
290 295 300
Tyr Gln Asn Ala Arg Met Trp Tyr Phe Gly Cys Tyr Phe Cys Leu
305 310 315 320
Pro Ile Leu Phe Thr Val Thr Cys Gln Leu Val Thr Trp Arg Val Arg
325 330 335
Gly Pro Pro Gly Arg Lys Ser Glu Cys Arg Ala Ser Lys His Glu Gln
340 345 350
Cys Glu Ser Gln Leu Asn Ser Thr Val Val Gly Leu Thr Val Val Tyr
355 360 365
Ala Phe Cys Thr Leu Pro Glu Asn Val Cys Asn Ile Val Val Ala Tyr
370 375 380
Leu Ser Thr Glu Leu Thr Arg Gln Thr Leu Asp Leu Leu Gly Leu Ile
385 390 395 400
Asn Gln Phe Ser Thr Phe Phe Lys Gly Ala Ile Thr Pro Val Leu Leu
405 410 415
Leu Cys Ile Cys Arg Pro Leu Gly Gln Ala Phe Leu Asp Cys Cys
420 425 430
Cys Cys Cys Cys Glu Glu Cys Gly Gly Ala Ser Glu Ala Ser Ala Ala
435 440 445
Asn Gly Ser Asp Asn Lys Leu Lys Thr Glu Val Ser Ser Ser Ile Tyr
450 455 460
Phe His Lys Pro Arg Glu Ser Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Thr Pro
465 470 475 480
Cys

9. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 als Antigen zur Erzeugung von spezifischen Antikörpern.

10. Antikörper, die spezifisch das Protein nach Anspruch 1 erkennen.

11. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.

12. Verwendung einer zu der Sequenz gemäß Anspruch 3 komplementären Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.

13. Verfahren zur Identifizierung von Antagonisten und Agonisten für das Protein gemäß Anspruch 1 indem man Zellen, die das Protein gemäß Anspruch 1 auf der Zelloberfläche tragen mit einer Vielzahl zu untersuchender Substanzen (Testsubstanzen) zusammenbringt, und anschließend die biologische Aktivität des Rezeptors in An- und Abwesenheit der Testsubstanz vergleicht.

14. Verfahren zum Testen von Substanzen hinsichtlich ihrer Eigenschaft als Ligand für das Protein gemäß Anspruch 1 zu fungieren, das folgende Schritte umfaßt:

a) Expression des Proteins nach Anspruch 1 in eukaryontischen Zellen,

b) Inkubation dieser Zellen mit Proteinextrakten, bevorzugt aus Gehirngewebe stammend,

c) Ermittlung der Bindung der zu untersuchenden Substanz an das Protein gemäß Anspruch 1 und und der Aktivierung durch Messung der cAMP Konzentration oder des Calciumflusses in der Zelle.

15. Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Nukleinsäure nach Anspruch 3 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer bekannten Menge an Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder einer bekannten Menge an Oligonukleotiden, die als Primer für eine Amplifikation der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 geeignet sind,

b) Nachweis der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 durch spezifische Hybridisierung oder PCR-Amplifikation,

c) Vergleich der Menge an hybridisierender Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder an durch PCR Amplifikation gewonnener Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 mit einem Standard.

16. Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis eines Proteins gemäß Anspruch 1 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

a) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Antikörper, der spezifisch gegen das Protein gemäß Anspruch 1 gerichtet ist,

b) Nachweis des Antikörper/Antigenkomplexes,

c) Vergleich der Mengen des Antikörper/Antigenkomplexes mit einem Standard.

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ctcggaagc gcgcattgt gttggt

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gagccacc agatgacagc caactt

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tgaaggcac ggcagacaa gaaacg

Patentansprüche

1. Isoliertes Protein, enthaltend die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhaltliche Sequenz, wobei wenigstens noch eine der wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID NO:2 dargestellten Proteins erhalten bleibt.

2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein humanes Protein handelt.

3. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein nach Anspruch 1.

4. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein codiert, das wenigstens 60 % identisch mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz hat.

5. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO:1 dargestellte Sequenz enthält.

6. Rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 3 funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Regulationselement.

7. Wirtszell, transformiert mit einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3.

8. Wirtszell, transformiert mit einem rekombinanten Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 6.